

Flore microbienne du fromage de Roquefort

II. - STAPHYLOCOQUES ET MICROCOQUES

par

J.J. DEVOYOD

*Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie
des Produits Animaux,*

I.N.R.A., JOUY-en-JOSAS (Yvelines) FRANCE

*(Avec la collaboration technique de Marie-Josèphe LAPIERRE
et M. DUCCELLIEZ)*

INTRODUCTION

Lors d'un travail précédent (Devoyod et Bret, 1966), nous avons étudié l'évolution des staphylocoques et des microcoques au cours d'une fabrication traditionnelle de fromage de Roquefort et nous avons constaté une prédominance des microcoques par rapport aux staphylocoques après le salage. De plus, les microcoques isolés au cours de l'affinage présentaient des caractères protéolytiques de plus en plus marqués au fur et à mesure que la durée d'affinage se prolongeait. Le fait que les microcoques apparaissaient seulement après le salage et en surface laissait supposer qu'une partie au moins de ces microcoques était apportée par le sel.

Pour préciser l'origine des microcoques et staphylocoques du fromage de Roquefort, nous avons étudié les caractères biochimiques des microorganismes isolés de la mamelle de brebis, de l'air des bergeries et des salles de fabrication, du sel utilisé pour le salage et du fromage à différents stades de la fabrication et de l'affinage.

MATERIEL ET METHODES

A) Isolement des microcoques et des staphylocoques

Les échantillons de lait, prélevés stérilement à la mamelle, ont été ensemencés en surface, à raison de 0,05 ml, sur de la gélose « Tryptose Blood Agar Base » (Difco n° 232) additionnée de 5 p. 100 de sang de mouton et répartie en boîtes de Petri.

La recherche des microcoques et des staphylocoques dans les échantillons de fromage a été faite selon les techniques décrites précédemment (Devoyod *et al.*, 1968). Toutefois, pour les échantillons prélevés au cours des 40 premiers jours de la fabrication, on effectuait, en plus de l'ensemencement direct sur milieu gélosé, un enrichissement des suspensions de fromage par incubation en milieu salé. A 5 ml de bouillon salé (15 p. 100 de ClNa), ajusté à pH 7, on ajoutait 5 ml de suspension de fromage. Après incubation à 37° C pendant 48 heures, on étalait 0,1 ml de la culture sur chacun des trois milieux suivants : milieu de Chapman, milieu « Tryptose Blood Agar Base » (Difco n° 232), additionné de 5 p. 100 de sang de mouton et milieu ETGPA (Baird - Parker, 1962).

Pour rechercher les microcoques et les staphylocoques dans l'air des bergeries et des salles de fabrication, des boîtes de Petri contenant du milieu de Chapman ont été exposées à l'air pendant des temps qui variaient de 3 à 20 minutes. Pour rechercher les microcoques dans les échantillons de sel marin, des dilutions décimales étaient faites dans du Ringer non dilué ; 0,1 ml de ces dilutions était étalé sur milieu de Chapman.

Pour chaque échantillon, 10 à 20 colonies ont été prélevées et ensemencées sur bouillon de Shaw *et al.* (1951) modifié, de composition suivante : Bacto Tryptone 1 p. 100, Bacto Yeast Extract 0,5 p. 100, Glucose 0,5 p. 100, Chlorure de sodium 0,5 p. 100, Phosphate bipotassique 0,2 p. 100 (milieu de base). Après purification, les souches étaient conservées à + 4° C sur gélose inclinée.

B) Identification

Les caractères biochimiques suivants ont été étudiés suivant les techniques décrites par Baird-Parker (1963) :

- Production de catalase,
- Recherche de la coagulase libre (pour les staphylocoques seulement),
- Production d'acétoïne,
- Recherche de la phosphatase,
- Réduction des nitrates,
- Désamination de l'arginine,
- Hydrolyse de la gélatine,
- Production d'acide à partir des glucides et alcools,
- Hydrolyse de l'amidon,
- Hydrolyse de l'urée,
- Résistance au chlorure de sodium,
- Croissance à différentes températures,
- Croissance à différents pH,
- Production d'H₂S,
- Utilisation du citrate, du lactate et des sels d'ammonium.

Les caractères suivants ont été étudiés selon des techniques différentes de celles décrites par Baird-Parker :

Production d'acide en anaérobiose à partir du glucose

Des tubes de gélose nutritive « Plate Count Agar » (Difco n° 479), additionnée de pourpre de bromocrésol à 0,02 p. 100 (concentration finale) étaient maintenus à l'ébullition pendant 20 mn, puis refroidis à 47° C. Après ensemencement, le contenu des tubes était transvasé dans des tubes stériles de 8 x 400 mm (Raibaud *et al.*, 1966), puis mis à incuber à 30° C ; ces derniers étaient examinés après 24 et 48 h d'incubation.

Production d'indole

Les souches étaient cultivées sur eau peptonée à 0,5 p. 100 pendant 10 jours à 30° C. A 0,5 ml de culture on ajoutait 1 ml de solution acétique à 1 p. 100 de xanthidrol. Après séjour de 10 mn au bain-marie bouillant, une coloration pourpre intense indiquait une réaction positive (Dickinson et Mocquot, 1961).

Caséolyse

Les souches étaient ensemencées en surface sur gélose nutritive additionnée de lait écrémé stérile (10 ml de lait écrémé stérile dans 100 ml de gélose nutritive répartie en boîtes de Petri). Les colonies qui présentaient un halo clair après addition de chlorure mercurique acide (Frazier, 1926) étaient considérées comme caséolytiques.

Lipolyse

La recherche de l'hydrolyse de la tributyrine était faite selon la méthode conseillée par « British Standards Institution » (1940).

C) Etude de la croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium et à différents pH.

Le développement des staphylocoques et des microcoques a été étudié par néphélométrie à l'aide d'un biophotomètre enregistreur Bonnet-Maury et Jouan. Le principe de cet appareil est le suivant : un faisceau lumineux traverse une cuve contenant la culture et vient exciter une cellule photo-électrique reliée à un enregistreur. L'appareil est conçu pour enregistrer l'évolution simultanée de 6 cultures contenues dans une enceinte thermostatée. Le milieu liquide utilisé était le milieu de base sans sel ajusté à pH 5 — 6 ou 7. Il était additionné de 0 — 5 ou 7,5 p. 100 de chlorure de sodium. L'enceinte thermostatée était réglée à 30° C $\pm$ 0,2° C.

RESULTATS

Seuls ont été considérés comme staphylocoques, les germes capables de produire de l'acide à partir du glucose en anaérobiose.

TABLEAU 1. — Evolution des staphylocoques au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort.

	Staph. coagulase +				Staph. coagulase —			
	Surface		Centre		Surface		Centre	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Fromages en salle chaude (48 heures après emprésurage)	+	+	+	+	+	+	+	+
Fromages en salle froide (4 jours après emprésurage)	+	+	(+)	+	+	+	+	+
Avant salage (10 jours après emprésurage)	(+)	+	(+)	(+)	+	+	+	+
Après salage (17 jours après emprésurage)	—	(+)	—	(+)	—	(+)	+	+
Après 10 jours d'affinage (27 jours après emprésurage)	—	—	—	—	—	—	(+)	+
Après 20 jours d'affinage (37 jours après emprésurage)	—	—	—	—	—	—	—	(+)
Après 30 jours d'affinage (47 jours après emprésurage)	—	—	—	—	—	—	—	—

A Numération sur gélose à partir des échantillons de fromages.

B Recherche des staphylocoques après enrichissement des suspensions de fromage à 37°C en milieu salé (concentration finale en ClNa = 7,5 %).

+ Résultats toujours positifs.

— Résultats toujours négatifs.

(+) Résultats variables.

1) Flore mammaire de la brebis

Chaque échantillon correspondait au mélange du lait prélevé sur les deux quartiers de la mamelle. Sur 52 échantillons de lait prélevés stérilement à la mamelle, 47 ne contenaient aucun micro-organisme dans 0,05 ml de lait, 2 ne contenaient que des staphylocoques coagulase-positifs et 3 contenaient en même temps des staphylocoques coagulase-négatifs et des microcoques.

2) Recherche des staphylocoques au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort

Pour chaque échantillon de fromage, nous avons recherché les staphylocoques, d'une part par ensemencement direct du milieu gélosé (milieu ETGPA et milieu de Chapman) et, d'autre part, par enrichissement des suspensions de fromage en milieu salé. Les résultats obtenus au cours de 5 fabrications traditionnelles sont donnés dans le tableau 1.

Nous voyons que les staphylocoques coagulase-positifs disparaissent après le salage. Dans la majorité des cas, nous avons trouvé avant salage (10 jours après l'emprésurage) moins de 10 staphylocoques par gramme au centre du fromage.

3) Caractères biochimiques des souches isolées

a) Staphylocoques coagulase-positifs

51 souches de staphylocoques coagulase-positifs ont été isolées du lait de brebis et du fromage au cours des premiers stades de la fabrication.

Les caractères biochimiques de ces souches sont donnés dans le tableau 2.

La plus grande partie des souches était caséolytique; pour ces souches, les diamètres des zones de clarification autour des colonies formées sur lait gélosé étaient toujours supérieurs à 3 cm. En présence d'arabinose et de raffinose, les souches se développaient mais ne produisaient pas d'acide.

En présence de 15 p. 100 de chlorure de sodium, les cultures qui présentaient un développement prenaient un aspect grumeleux et avaient tendance à former un dépôt au fond des tubes alors que, pour des concentrations plus faibles en chlorure de sodium, les cultures apparaissaient sous forme d'un léger sédiment.

b) Staphylocoques coagulase-négatifs

163 souches de staphylocoques coagulase-négatifs ont été isolées de lait de brebis et de fromage au cours des premiers stades de la fabrication et de l'affinage. En utilisant les critères

TABLEAU 2. — Caractères biochimiques des souches de staphylocoques coagulase-positifs isolées de lait de brebis et de fromage de Roquefort.

Coagulase		+
Phosphatase		+
Acétoïne		+
Hémolyse (sang de mouton)	$\left\{ \begin{array}{l} \beta \\ \alpha\beta \end{array} \right.$	16/51 35/51
Réduction des nitrates		+
Production d'NH ₃ à partir d'arginine		+
Caséolyse		45/51
Lipolyse		+
Hydrolyse de la gélatine		40/51
Production d'acide à partir des glucides et des alcools	Glucose	+
	Galactose	29/51
	Lactose	+
	Saccharose	+
	Maltose	+
	Arabinose	—
	Raffinose	—
	Glycérol	+
	Mannitol	+
Hydrolyse de l'amidon		—
Croissance à 10 °C		29/51
Croissance à 45 °C		+
Croissance en présence de chlorure de sodium	10 %	+
	15 %	45/51
Utilisation du citrate		—
Utilisation du lactate		—
Utilisation des sels d'ammonium		—

$$\text{fraction} = \frac{\text{nombre de souches positives}}{\text{nombre de souches essayées}}$$

de classification définis par Baird-Parker (1963), nous avons pu classer ces souches en trois sous-groupes : 39 appartenaient au sous-groupe II (phosphatase + ; acétoïne +), soit 24 p. 100 du total des souches de staphylocoques coagulase-négatifs isolées ; 101 appartenaient au sous-groupe III (phosphatase + ; acétoïne —), soit 62 p. 100 des souches et 23 appartenant au sous-groupe VI (phosphatase — ; mannitol +) soit 14 p. 100 des souches. Dans le tableau 3, nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus par Asperger (1965). Nous constatons que les staphylocoques coagulase-négatifs appartenant au sous-groupe III de la classification de Baird-Parker sont les plus nombreux. Nous n'avons pas trouvé de staphylocoques correspondant au sous-groupe V (phosphatase — ;

TABLEAU 3. — Répartition dans les différents sous-groupes de la classification de Baird-Parker des staphylocoques coagulase-négatifs isolés du lait et du fromage.

	SOUS-GROUPES DE BAIRD-PARKER				
	II	III	IV	V	VI
Lait cru de brebis	5	19	0	0	3
Fromage de Roquefort	34	82	0	0	20
Lait cru de vache (Manitol - 1965)	2	10	0	2	3
Fromage (Manitol - 1965)	2	9	0	3	2

mannitol — et lactose +) ni au sous-groupe IV (phosphatase — ; mannitol — et lactose —).

Les caractères biochimiques des souches que nous avons isolées sont donnés dans le tableau 4. Dans ce même tableau nous avons porté à titre de comparaison les caractères biochimiques des souches isolées des produits laitiers par Asperger (1965) et des souches isolées du lard et de la peau par Baird-Parker (1963).

c) Microcoques

573 souches de microcoques ont été isolées de l'air des bergeries, des salles de fabrication et des caves d'affinage, du lait, du sel utilisé pour le salage et du fromage au cours des différents stades de la fabrication et de l'affinage. La répartition des microcoques dans les différents sous-groupes de la classification de Baird-Parker est donnée dans le tableau 5. Dans ce même tableau, nous avons porté à titre de comparaison les résultats obtenus par Asperger (1965).

Nous voyons que la plupart (74 p. 100) des souches de microcoques isolées de l'air appartiennent au sous-groupe 6 de la classification de Baird-Parker (glucose + acétoïne — et phosphatase +).

Les microcoques isolés du lait de brebis appartiennent aux sous-groupes 1 (glucose +, acétoïne +, arabinose —, mannitol — et lactose —), 2 (glucose +, acétoïne +, arabinose —, mannitol — et

TABLEAU 4. — Comparaison des caractères biochimiques des souches de staphylocoques coagulase-négatifs isolées du lait de brebis et du fromage de Roquefort avec les caractères biochimiques de staphylocoques de diverses origines.

	Lait de brebis et fromage de Roquefort			Produits laitiers ASPERGER (1965)			Lard et peau (BAIRD-PARKER, 1963)			
	Sous-groupes de BAIRD-PARKER			Sous-groupes de BAIRD-PARKER			Sous-groupes de BAIRD-PARKER			
	II	III	VI	II	III	VI	II	III	VI	
Hémolyse (sang de mouton)	—	—	—	1/18	1/47	—				
Réduction des nitrates	+	+	+	13/18	36/47	4/9	303/354	+	94/96	
Production d'NH ₃ à partir d'argi- nine	+	+	+	11/18	9/47	5/9	244/354	23/24	75/96	
Caséolyse	+	+	17/23	6/18	11/47	—	342/354	+	62/96	
Hydrolyse de la tributyrine	+	+	+	17/18	37/47	6/9				
Hydrolyse de la gélatine	20/39	+	17/23	10/18	12/47	1/9	249/354	+	12/96	
Production d'acide à partir des glucides et alcools	glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	
	galactose	27/39	87/101	13/23	16/18	38/47	6/9	228/354	15/24	7/96
	lactose	32/39	+	+	17/18	36/47	8/9	333/354	21/24	12/96
	saccharose	+	+	20/23	15/18	24/47	7/9			
	maltose	+	+	19/23	17/18	31/47	7/9	+	—	79/96
	arabinose	—	—	—	2/18	16/47	—	—	—	—
	raffinose	—	—	—	1/18	6/47	—	—	—	—
	glycérol	—	—	15/18	24/47	8/9	353/354	23/24	+	
Hydrolyse de l'amidon	—	—	—				—	—	—	
Croissance à 10 °C	5/39	14/101	3/23	5/18	45/47	1/9	2/227	23/24	2/69	
Croissance à 45 °C	+	+	+				216/227	23/24	55/69	
Croissance en { 10 %	+	+	+							
présence de { 15 %	27/39	47/101	11/23	9/18	11/47	5/9	311/354	21/21	53/69	
Utilisation des sels d'ammonium	—	—	2/23				10/354	—	1/69	

+ : toutes les souches positives

— : toutes les souches négatives

$$\text{fraction} = \frac{\text{nombre de souches positives}}{\text{nombre de souches essayées}}$$

TABLEAU 5. — Répartition dans les différents sous-groupes de la classification de Baird-Parker des microcoques isolées de l'air, du sel, du lait et du fromage.

	SOUS-GROUPES DE BAIRD-PARKER							TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	
Air	3	0	9	0	2	40	0	54
Lait cru de brebis	2	8	0	0	6	4	0	20
Sel	0	2	25	2	8	3	7	47
Fromage de Roquefort (surface)	0	2	58	119	74	63	0	316
Fromage de Roquefort (centre)	1	9	47	18	42	12	7	136
Nombre total de souches isolées	6	21	139	139	132	122	14	573
Pourcentage dans les différents groupes	1,0	3,7	24,3	24,3	23,0	21,3	2,4	100
Lait de vache (ASPERGER, 1965)	0	11	4	0	5	3	3	26
Fromage (ASPERGER, 1965)	0	0	13	0	8	6	0	27

lactose +), 5 (glucose +, acétoïne — et phosphatase —) et 6 de la classification de Baird-Parker.

Dans les échantillons de sel, les microcoques appartenant au sous-groupe 3 (glucose +, acétoïne +, arabinose — et mannitol +) sont prédominants (25 sur 47, soit 53 p. 100 des souches isolées du sel).

Les microcoques isolés du fromage de Roquefort appartiennent principalement aux sous-groupes 3, 4, 5 et 6.

4) Croissance des staphylocoques et des microcoques en milieu salé et à différents pH.

Il est probable que le pH et la teneur en sel du fromage sont les facteurs les plus importants qui conditionnent la croissance des staphylocoques et des microcoques dans le fromage. Pour préciser le rôle de ces facteurs, nous avons étudié, par néphélométrie, la croissance, en milieu salé et à différents pH, des différents types de staphylocoques et de microcoques isolés dans cette étude.

La figure 1 montre, à titre d'exemple, les courbes de croissance en milieu salé et à différents pH, de 8 souches de staphylocoques et de microcoques. Dans le tableau 6, nous avons porté la durée de la phase de latence et la vitesse de croissance des germes en phase logarithmique correspondant aux courbes de la figure 1.

a) Staphylocoques

En l'absence de chlorure de sodium, la souche de staphylocoques coagulase-positifs isolée à la surface du fromage 4 jours après l'emprésurage (figure 1 A) se développe aussi bien à pH 6 qu'à pH 7. Par contre à pH 5, nous constatons que la durée de la phase de latence a quadruplé et que la vitesse de croissance est réduite de moitié.

En présence de 7,5 p. 100 de chlorure de sodium et à pH 6, la durée de la phase de latence a doublé mais la vitesse de croissance reste sensiblement la même ; à pH 5, la durée de la phase de latence est fortement augmentée et la vitesse de croissance est 6 fois plus faible qu'à pH 7.

Nous avons obtenu des résultats semblables avec les autres souches de staphylocoques coagulase-positifs essayées. La diminution du pH et l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium du milieu a donc pour conséquence un retard et un ralentissement de la croissance des staphylocoques coagulase-positifs isolés du lait de brebis et du fromage de Roquefort.

La croissance de la souche de staphylocoques coagulase-négatifs appartenant au sous-groupe II de la classification de Baird-Parker et isolée du fromage 48 heures après l'emprésurage, est

TABLEAU 6. — Croissance des staphylocoques et des microcoques en milieu salé et à différents pH.

	Temps de latence (en heures)	Vitesse de croissance en phase logarith- mique (Δ DO x 10/h)		Temps de latence (en heures)	Vitesse de croissance en phase logarith- mique (Δ DO x 10/h)
A 1	2	21,5	E 1	3	16,5
2	2	21,5	2	8	11,5
3	2	21,5	3	10	15,0
4	4	20,5	4	19	6,5
5	8	10,5	5	> 60	—
6	13	7,5	6	> 60	—
B 1	3	17,5	F 1	11	8,0
2	4	17,5	2	4	20,0
3	10	11,0	3	20	1,5
4	12	9,5	4	8	13,5
5	19	3,5	5	> 60	—
6	30	—	6	> 60	—
C 1	3	33,0	G 1	7	10,0
2	6	18,5	2	2	17,5
3	4,5	23,5	3	8	5,5
4	15	10,0	4	2	17,5
5	6	18,5	5	13	3,5
6	30	3,8	6	4	13,5
D 1	3	22,0	H 1	1,5	25,0
2	10	8,0	2	1,5	25,0
3	6	14,5	3	1,5	25,0
4	20	2,0	4	2	22,0
5	> 60	—	5	5	22,0
6	> 60	—	6	8	11,0

Pour la signification des numéros et des lettres voir figure 1.

nettement retardée lorsque le pH du milieu diminue (figure 1 B). A pH 5, et en l'absence de $ClNa$, la durée de la phase de latence est 6 fois plus grande qu'à pH 7. De plus, la vitesse de croissance est très sensiblement diminuée : à pH 5, elle est 5 fois plus faible qu'à pH 7. Cette souche est acido-sensible et les staphylocoques de ce type disparaissent rapidement du fromage.

Les courbes de croissance de la souche de staphylocoques coagulase-négatifs appartenant au sous-groupe III et isolée du centre du fromage après salage (fig. 1 C) montrent que cette souche est peu sensible d'une part à la diminution du pH , d'autre part à l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Ce n'est que lorsque ces deux facteurs agissent simultanément que l'action sur la croissance est sensible ; ainsi à pH 5 et en présence de 7,5 p. 100 de chlorure de sodium, la durée de la phase de latence est décuplée et la vitesse de croissance est dix fois plus faible qu'à pH 7.

Dans le fromage, ces staphylocoques ne disparaîtront qu'après le salage ; cette disparition sera d'ailleurs plus lente au centre par suite de la pénétration progressive du sel (voir § 2 du chapitre Résultats).

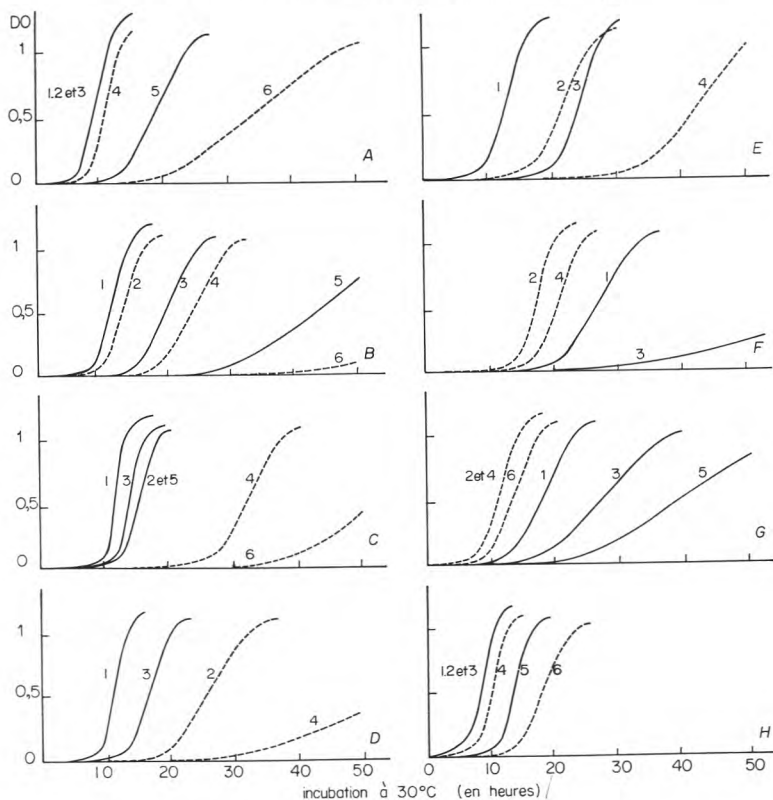
b) Microcoques

En l'absence de chlorure de sodium, la croissance de la souche de microcoque appartenant au sous-groupe 6 et isolée de l'air de bergerie (fig. 1 D) est très retardée en milieu acide, puisqu'à pH 5 et en l'absence de $ClNa$, aucune croissance ne s'était manifestée après 60 heures d'incubation. Cette souche est également sensible à l'action du chlorure de sodium ; nous voyons en effet qu'à pH 7 et en présence de 7,5 p. 100 de chlorure de sodium, la durée de la phase de latence est triplée et la vitesse de croissance est trois fois plus faible que pour une culture à pH 7 en l'absence de sel.

Dans le cas de la souche de microcoques appartenant au sous-groupe 2 et isolée du lait de brebis (fig. 1 E) nous constatons que la croissance est retardée et diminuée lorsque le pH diminue et que la concentration en $ClNa$ augmente. Cette souche est un peu plus sensible au pH qu'au sel.

Les courbes de croissance de 2 souches de microcoques appartenant au sous-groupe 3 et isolées d'échantillons de sel (fig. 1 F et 1 G) montrent que ces microorganismes sont halophiles : la durée de la phase de latence est plus faible et la vitesse de croissance est plus grande en milieu salé qu'en milieu non salé. La différence importante entre ces deux souches réside dans leur sensibilité au pH . La première souche (fig. 1 F) est très sensible au pH du milieu tandis que la seconde (fig. 1 G) ne l'est pratiquement pas.

FIGURE 1
CROISSANCE DES STAPHYLOCOQUES ET DES MICROCOQUES
EN MILIEU SALE ET A DIFFERENTS pH



En abscisse : durée d'incubation à 30°C (en heures).

En ordonnée : densités optiques calculées à partir des valeurs de % de transmission données par le biophotomètre enregistreur.

1 bouillon à pH 7 et 0 % de ClNa — 2 bouillon à pH 7 et 7,5 % de ClNa
 3 bouillon à pH 6 et 0 % de ClNa — 4 bouillon à pH 6 et 7,5 % de ClNa
 5 bouillon à pH 5 et 0 % de ClNa — 6 bouillon à pH 5 et 7,5 % de ClNa.

A : staphylocoque coagulase-positif isolé de la surface du fromage 4 jours après emprésurage.

B : staphylocoque coagulase-négatif (sous-groupe II) isolé de la surface du fromage 48 heures après emprésurage.

C : staphylocoque coagulase-négatif (sous-groupe III) isolé du centre du fromage après salage.

D : microcoque (sous-groupe 6) isolé de l'air de bergerie.

E : microcoque (sous-groupe 2) isolé de lait de brebis.

F : microcoque (sous-groupe 3) isolé du sel.

G : microcoque (sous-groupe 3) isolé du sel.

H : microcoque (sous-groupe 4) isolé de la surface du fromage 10 jours après salage.

La souche de microcoques appartenant au sous-groupe 4 et isolée du fromage 10 jours après salage (fig. 1 H) est halotolérante; nous constatons que la concentration en chlorure de sodium n'a pas d'effet très marqué sur la croissance de cette souche.

DISCUSSION

1) Flore mammaire de la brebis

Sur le petit nombre d'échantillons de lait prélevés stérilement à la mamelle nous avons trouvé une flore microbienne très peu abondante. Nos résultats confirment d'ailleurs ceux trouvés par Plommet (1959) et portant sur 450 échantillons.

2) Evolution des staphylocoques au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort

La disparition des staphylocoques au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort est vraisemblablement due tout d'abord au développement des bactéries lactiques et ensuite à l'action du sel. Nous avons constaté, en effet, que les staphylocoques disparaissaient plus rapidement dans les fromages lorsque les bactéries lactiques étaient prédominantes dès les premiers stades de la fabrication.

Dans le présent travail, nous avons recherché les staphylocoques coagulase-positifs dans du fromage fabriqué à partir de lait *cru* de brebis; or il est intéressant de comparer nos résultats avec ceux obtenus par Tuckey *et al.* (1964) sur des fromages fabriqués à partir de lait de vache pasteurisé (Cheddar, Emmental, Limbourg). Ces auteurs ont inoculé du lait pasteurisé avec une souche de *Staphylococcus aureus* de façon à obtenir 10^5 staphylocoques par ml de lait. Le nombre de ces microorganismes augmentait dans le caillé jusqu'au salage des fromages. Parfois, ce nombre augmentait après passage sous presse et pendant les 21 premiers jours d'affinage; puis, il diminuait au cours de l'affinage, mais en aucun cas, la disparition de *Staph. aureus* n'était complète au cours de l'affinage.

Dans notre cas, le nombre de staphylocoques coagulase-positifs que nous avons trouvés dans le lait de fabrication du fromage de Roquefort était sensiblement du même ordre que celui des laits utilisés par Tuckey *et al.* (10^5 à 10^6 germes par ml de lait). Comme ces auteurs, nous avons constaté que le nombre des staphylocoques était plus élevé dans le caillé que dans le lait de fabrication (en général 10 fois plus élevé). Mais nos résultats confirment cependant nos observations antérieures (Devoyod et Bret, 1966; Devoyod *et al.*, 1968): ils montrent que le nombre de staphylocoques diminue fortement jusqu'au salage et que ces germes disparaissent

après le salage ; en aucun cas, nous n'avons pu mettre en évidence la présence de ces microorganismes au cours de l'affinage.

Les facteurs qui interviennent dans cette disparition sont sans doute multiples. Le pH du milieu joue certainement un rôle important ; le centre du fromage de Roquefort reste à un pH inférieur à 5 pendant 4 semaines environ. La teneur en sel est un autre facteur dont l'action vient compléter celle du pH .

A la surface du fromage, nous avons trouvé après salage (Devoyod *et al.* 1968), des teneurs en ClNa comprises entre 15 et 20 p. 100 (exprimées en grammes pour cent de la phase aqueuse) et des valeurs de pH inférieures à 5. Au centre, par contre, nous avons trouvé des teneurs en ClNa voisines de 6 p. 100 pour des valeurs de pH également inférieures à 5 ; dans ce cas, la seule action combinée du pH et du sel ne suffit pas à expliquer la disparition *rapide* des staphylocoques coagulase-positifs. Nous avons en effet isolé des souches de staphylocoques coagulase-positifs capables de se développer à pH 5 dans un milieu liquide contenant 7,5 p. 100 de chlorure de sodium (Cf. courbe A de la figure 1). Il y a donc d'autres facteurs d'inhibition des staphylocoques que l'on ne connaît pas. Le comportement de ces germes n'est certainement pas le même dans un milieu de culture et dans le fromage.

En ce qui concerne les staphylocoques coagulase-négatifs, ils disparaissent de la surface du fromage après le salage comme les staphylocoques coagulase-positifs. Par contre, au centre du fromage, ils subsistent plus longtemps que ces derniers ; ainsi, par dénombrement sur milieu gélosé, nous trouvons parfois des staphylocoques coagulase-négatifs après 10 jours d'affinage. Les recherches effectuées sur des échantillons prélevés 47 jours après l'emprésurage ont toutes été négatives.

3) Caractères biochimiques des souches isolées

a) Staphylocoques coagulase-positifs

Il ne semble pas y avoir de relation entre les types d'hémolyse rencontrés chez ces souches et leur résistance aux conditions particulières du fromage. Nous avons trouvé les deux types d'hémolyse β et $\alpha\beta$ (mais pas d'hémolyse α) aussi bien parmi les souches isolées dans le caillé à la mise en moules que parmi les souches isolées juste avant salage.

Les caractères biochimiques des staphylocoques coagulase-positifs isolés du lait de brebis et du fromage de Roquefort correspondent bien aux caractères des staphylocoques coagulase-positifs isolés des produits laitiers par Asperger (1965). La principale différence entre nos résultats et les siens réside dans la croissance de ces microorganismes à basse température. Nous avons constaté que 29 souches seulement sur 51 se développaient à 10° C,

alors qu'Asperger indique que 4 souches sur 5 étaient capables de se développer à 10-12° C. Il est vraisemblable que la température limite de croissance d'un certain nombre de souches de staphylocoques coagulase-positifs se situe aux environs de 10° C.

Les souches de staphylocoques coagulase-positifs isolées ont été sérotypées par le laboratoire d'Etudes sur les Mammites C.R.V.Z., Tours : ce laboratoire a trouvé que les staphylocoques isolés du fromage étaient du même type sérologique (type 16) que ceux qui provoquent des mammites chez les brebis. Il est donc probable qu'une partie des staphylocoques coagulase-positifs du fromage proviennent d'animaux infectés.

b) Staphylocoques coagulase-négatifs

Les staphylocoques coagulase-négatifs isolés du lait de brebis et du fromage de Roquefort peuvent être classés selon les critères définis par Baird-Parker.

Les staphylocoques appartenant au sous-groupe III de la classification de Baird-Parker semblent être assez représentatifs des produits laitiers. En effet, dans son étude sur les staphylocoques isolés principalement du lard et de la peau, cet auteur a indiqué que, sur 546 souches de staphylocoques coagulase-négatifs, 24 seulement appartenaient au sous-groupe III, alors que dans notre étude, ces staphylocoques représentent 62 p. 100 des staphylocoques coagulase-négatifs (cf. Tableau 3). Nos résultats confirment ceux obtenus par Asperger. Dans le lait cru de vache et le fromage, cet auteur a identifié 19 staphylocoques appartenant au sous-groupe III sur 33 souches de staphylocoques coagulase-négatifs, soit 57 p. 100 des souches isolées.

Les résultats de l'étude des caractères biochimiques des souches que nous avons isolées sont comparables à ceux obtenus par Baird-Parker ; par contre, les souches décrites par Asperger semblent être moins protéolytiques et principalement celles appartenant au sous-groupe III (tableau 4). En ce qui concerne la production d'acide à partir des glucides et alcools, nos résultats sont comparables à ceux de Baird-Parker.

Toutes les souches de staphylocoques coagulase-négatifs isolées des échantillons prélevés après le salage se développaient en présence de 15 p. 100 de chlorure de sodium et à pH 7.

c) Microcoques

Il ne semble pas qu'il y ait prédominance d'un type particulier de microcoques dans le lait de brebis. Ces organismes se répartissent dans les sous-groupes 1, 2, 5 et 6 de la classification de Baird-Parker (cf. Tableau 5).

Nous avons constaté antérieurement (Devoyod et Bret, 1966 ; Devoyod *et al.*, 1968) que, lors du salage, il se produisait une modi-

fication importante de la flore superficielle. Or le sel apporte au fromage des microorganismes et principalement des microcoques. Nous avons constaté en effet que le nombre des microorganismes contenus dans les échantillons de sel analysés variait de quelques centaines par gramme pour le sel emballé sous sacs plastiques, à 70 000 par gramme pour le sel stocké en vrac (ancienne méthode) et que les microcoques constituaient 70 p. 100 de cette flore. Ces microcoques appartiennent essentiellement au sous-groupe 3 de la classification de Baird-Parker.

De même que le sel joue un rôle sélectif vis-à-vis de la flore microbienne du fromage, de même on peut dire que le fromage présente une action sélective vis-à-vis de la flore microbienne du sel. En effet, tous les microcoques isolés du sel résistent naturellement à de fortes concentrations en chlorure de sodium, mais seuls peuvent se multiplier dans le fromage les microcoques halophiles ou halotolérants *en milieu acide*.

A la surface du fromage, nous trouvons après salage, comme dans les échantillons de sel, des microcoques appartenant au sous-groupe 3 (cf. Tableau 5). L'opération du salage se poursuivant sur plusieurs jours, d'autres types de microcoques que ceux rencontrés en flore dominante dans les échantillons de sel peuvent se multiplier ; en effet, nous avons isolé, à la surface du fromage, après salage, des microcoques appartenant aux sous-groupes 4, 5 et 6. Or nous avons constaté (cf. Tableau 5) que les microcoques appartenant au sous-groupe 6 sont prépondérants dans l'air et en particulier dans l'air des saloirs. Par contre, l'origine des microcoques des sous-groupes 4 et 5 est plus difficile à préciser.

A la surface, les conditions de développement des microcoques sont suffisamment favorables (si la présence d'oxygène est un facteur important de leur développement, les levures jouent certainement aussi un rôle essentiel), pour que les différences de teneur en microcoques des sels, c'est-à-dire les différences d'inoculum en microcoques des fromages, ne puissent avoir d'incidence sur le nombre de microcoques trouvés en surface après le salage. Que le sel contienne quelques centaines de microcoques par gramme ou qu'il en contienne quelques dizaines de milliers, nous trouvons au début de l'affinage sensiblement le même nombre de microcoques à la surface du fromage.

Au centre du fromage, ce n'est que 10 jours après le salage, lorsque les microcoques deviennent prédominants par rapport aux staphylocoques, que nous trouvons dans le fromage des microcoques semblables à ceux du sel. Par enrichissement en milieu hypersalé des dilutions de fromage nous n'avons pu, en aucun cas, mettre en évidence la présence de tels microcoques au centre du fromage avant le salage.

Nous avons constaté que plus le sel contenait de microcoques, plus nous trouvions de microcoques au centre du fromage au cours de l'affinage. Les microcoques que l'on trouve dans le fromage au cours de l'affinage proviennent donc essentiellement de l'ensemencement superficiel qui s'est produit au cours du salage. Il est vraisemblable qu'une partie au moins de ces microcoques est amenée de la surface vers le centre, lors du passage des fromages à la piqueuse.

Les microcoques appartenant au sous-groupe 4 (137 sur 452 souches isolées soit 30 p. 100) semblent être les microcoques les plus typiques du fromage de Roquefort. Si nous comparons nos résultats avec ceux obtenus par Asperger (cf. Tableau 5), nous constatons en effet que ces microcoques ne se trouvent pas dans les fromages fabriqués à partir de lait de vache étudiés par cet auteur. Il est possible que les souches que nous avons isolées provenaient du sel, car leurs caractères biochimiques étaient très voisins de ceux des 2 souches isolées à partir des échantillons de sel.

Au cours de l'affinage, après que les fromages aient été mis sous feuilles d'étain, nous avons constaté l'apparition de souches caséolytiques. A ce stade, nous avons isolé des microcoques capables de produire de l'hydrogène sulfuré à partir des acides aminés soufrés. Ils sont vraisemblablement à l'origine des petites taches noires (sulfure d'étain) que l'on trouve parfois sur la face des feuilles d'étain en contact avec le fromage.

4) Croissance des staphylocoques et des microcoques en milieu salé et à différents pH

a) Staphylocoques

L'étude de la croissance en milieu salé et à différents pH des staphylocoques coagulase-positifs montre que l'action associée du pH et du chlorure de sodium a pour conséquence un ralentissement de la croissance de ces microorganismes, en agissant à la fois sur la durée de la phase de latence et sur le taux de croissance. Comme nous l'avons dit précédemment, l'action du pH et du chlorure de sodium ne suffit cependant pas à expliquer la disparition des staphylocoques coagulase-positifs après le salage ; il est vraisemblable que d'autres facteurs d'inhibition interviennent.

En ce qui concerne les staphylocoques coagulase-négatifs, certains sont sensibles au pH du milieu et par conséquent ils disparaissent dès les premiers stades de la fabrication, d'autres sont sensibles à l'action combinée du pH et de la teneur en ClNa et de ce fait ces microorganismes ne disparaissent du fromage qu'après le salage.

b) Microcoques

L'étude de la croissance des microcoques en milieu salé et à différents pH montre que :

1° Les microcoques que l'on trouve dans le lait de brebis, qu'ils proviennent de la flore mammaire ou de contaminations ultérieures, sont particulièrement sensibles au pH . C'est ce qui peut expliquer le fait qu'ils disparaissent rapidement au cours des premiers stades de la fabrication.

2° Parmi les microcoques halophiles isolés des échantillons de sel marin utilisé pour le salage des fromages, certains sont sensibles à l'action du pH , d'autres pas. Seules les souches peu sensibles à l'action du pH peuvent se développer au cours de l'affinage.

(Reçu pour publication le 11 octobre 1968).

Résumé

214 souches de staphylocoques et 573 souches de microcoques ont été isolées de la mamelle de brebis, de l'air des bergeries et des salles de fabrication, du sel utilisé pour le salage des fromages et du fromage de Roquefort à différents stades de la fabrication et de l'affinage. Elles ont été classées selon les critères définis par Baird-Parker.

Les staphylocoques coagulase-positifs disparaissent dans le fromage au cours du salage.

Les microcoques que l'on trouve dans le fromage au cours de l'affinage proviennent vraisemblablement pour leur plus grande part du sel et de l'air des saloirs.

Summary

THE MICROBIAL FLORA OF ROQUEFORT CHEESE

II - STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI

214 strains of staphylococci and 573 strains of micrococci were isolated from ewe's udders, from the air of sheep-pens and of cheese-making and ripening rooms, from salt and from Roquefort cheese. These strains were classified according to the criteria defined by Baird-Parker.

Coagulase positive staphylococci disappeared during the salting period.

The micrococci, found in the cheese during the ripening period, come probably from the salt and from the atmosphere of the salting room.

Remerciements

Nous remercions M^{me} Plommet du Laboratoire d'Etudes sur les Mammites de sa précieuse collaboration dans l'étude sérologique des staphylocoques coagulase-positifs.

Nous remercions vivement M. Bret, Directeur du Laboratoire de la Société des Caves de Roquefort pour la collaboration qu'il nous a apportée dans la réalisation de notre étude.

Nos remerciements vont également à MM. Raibaud, Plommet et Auclair pour leurs suggestions et leurs critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans la présentation de ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASPERGER (H.) (1965). Zur Klassifikation der Mikrokokken-Staphylokokken aus milch-wirtschaftlicher Sicht. *Oster. Milchwirtschaft*, 20, 23.
- BAIRD-PARKER (A.C.). (1962). An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *J. appl. Bact.*, 25, 12.
- BAIRD-PARKER (A.C.). (1963). A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 30, 409.
- BRITISH STANDARDS INSTITUTION (1940). Stand. Specif. n° 895. Methods for the microbiological examination of butter.
- DEVOYOD (J.-J.) et BRET (G.) (1966). Evolution de la flore microbienne au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort. *XVI^e Cong. Int. de Laiterie* D-2, 585.
- DEVOYOD (J.-J.), BRET (G.) et AUCLAIR (J. E.) (1968). Flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage. *Le Lait*, 479-480, 613.
- DICKINSON (A. B.) et MOCQUOT (G.) (1961). Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. I. Enterobacteriaceae and the Gram-negative bacteria. *J. appl. Bact.*, 24, 252.
- FRAZIER (W. C.) (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. inf. Dis.*, 39, 302.
- PLOMMET (M.) (1959). Communication personnelle.
- RAIBAUD (P.), DICKINSON (A. B.), SACQUET (E.), CHARLIER (H.) et MOCQUOT (G.) (1966). La micro flore du tube digestif du rat. I. Techniques d'étude et milieux de culture proposés. *Ann. Inst. Pasteur*, 110, 568.
- TUCKEY (S. L.), STILES (M. E.), ORDAL (Z. J.) et WITTER (L. D.) (1964). Relation of cheese making operations to survival and growth of *Staphylococcus aureus* in different varieties of cheese. *J. Dairy Sci.*, 47, 604.
-